

17.12.03

日本国特許庁  
JAPAN PATENT OFFICE

3

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日 2003年10月10日  
Date of Application:

出願番号 特願2003-351560  
Application Number:  
[ST. 10/C]: [JP 2003-351560]

出願人 第一化学薬品株式会社  
Applicant(s): 磯部 公安

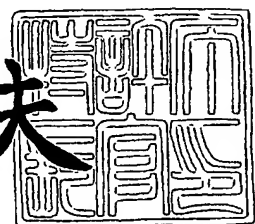
PRIORITY DOCUMENT  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH  
RULE 17.1(a) OR (b)

RECEIVED  
12 FEB 2004  
WIPO PCT

2004年 1月29日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

今井康夫



【書類名】 特許願  
【整理番号】 P04551510  
【あて先】 特許庁長官 殿  
【発明者】  
    【住所又は居所】 岩手県岩手郡松尾村松尾 4 - 1 1 5 第一化学薬品株式会社岩手工場生産技術センター内  
    【氏名】 山口 成樹  
【発明者】  
    【住所又は居所】 岩手県岩手郡松尾村松尾 4 - 1 1 5 第一化学薬品株式会社岩手工場生産技術センター内  
    【氏名】 小林 正幸  
【発明者】  
    【住所又は居所】 岩手県岩手郡松尾村松尾 4 - 1 1 5 第一化学薬品株式会社岩手工場生産技術センター内  
    【氏名】 熊谷 伸弥  
【発明者】  
    【住所又は居所】 茨城県那珂群東海村村松 2 1 1 7 第一化学薬品株式会社ゲノムサイエンス研究所内  
    【氏名】 晒名 貴美  
【発明者】  
    【住所又は居所】 岩手県盛岡市黒石野 3 丁目 1 5 - 4 0  
    【氏名】 磯部 公安  
【特許出願人】  
    【識別番号】 390037327  
    【氏名又は名称】 第一化学薬品株式会社  
【特許出願人】  
    【識別番号】 302068704  
    【氏名又は名称】 磯部 公安  
【代理人】  
    【識別番号】 110000084  
    【氏名又は名称】 特許業務法人アルガ特許事務所  
    【代表者】 中嶋 俊夫  
【先の出願に基づく優先権主張】  
    【出願番号】 特願2002-366389  
    【出願日】 平成14年12月18日  
【手数料の表示】  
    【予納台帳番号】 164232  
    【納付金額】 21,000円  
【提出物件の目録】  
    【物件名】 特許請求の範囲 1  
    【物件名】 明細書 1  
    【物件名】 図面 1  
    【物件名】 要約書 1  
    【物件名】 微生物受託証写 1  
    【援用の表示】 変更を要しないため特願 2 0 0 2 - 3 6 6 3 8 9 のものを援用する。  
    【包括委任状番号】 0200999  
    【包括委任状番号】 0217480

## 【書類名】 特許請求の範囲

## 【請求項 1】

次の酵素学的性質を有する D-アミノアシラーゼ。

- (a) 作用: N-アセチル-D-アミノ酸に作用し D-アミノ酸を生成する。
- (b) 分子量: SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動における測定で、分子量約 55,000 ダルトンを示す。
- (c) 等電点: 変性系 2 次元電気泳動における測定で、等電点 5.3 を示す。
- (d) 基質特異性: N-アセチル-D-アミノ酸に作用し、特に N-アセチル-D-バリンに良く作用し、N-アセチル-L-アミノ酸に作用しない。基質として、N-アセチル-D-バリン、N-アセチル-D-ロイシン、N-アセチル-D-メチオニン、N-アセチル-D-トリプトファン、N-アセチル-D-フェニルアラニン、N-アセチル-D-チロシンに作用し、N-アセチル-L-バリン、N-アセチル-L-ロイシン、N-アセチル-L-メチオニン、N-アセチル-L-トリプトファン、N-アセチル-L-フェニルアラニン、N-アセチル-L-チロシンには作用しない。
- (e) 温度安定性: pH 8.5 で 1 日加温した場合、4℃ から 30℃ まで比較的安定である。
- (f) 至適温度: pH 8 で 30 分反応させた場合、37℃ において作用が至適である。
- (g) pH 安定性: 温度 30℃ で 1 日加温した場合、pH 9 付近で安定であり、pH 6 付近から pH 11 付近でも比較的安定である。
- (h) 至適 pH: 温度 37℃ で反応させた場合、pH 8 から pH 8.5 付近で最も良く作用する。
- (i) 金属イオンの影響: 1 mmol/L の  $Mn^{2+}$ 、 $Co^{2+}$ 、 $Ni^{2+}$ 、 $Cu^{2+}$ 、 $Zn^{2+}$  で活性が阻害される。
- (j) 阻害剤の影響: 5 mmol/L のジチオスレイトール、2-メルカプトエタノール、o-フェナントリン、L-システインで活性が阻害される。

## 【請求項 2】

次の (a) 又は (b) のいずれかに記載のタンパク質からなる D-アミノアシラーゼ。

- (a) 配列番号 2 に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質。
- (b) 配列番号 2 に記載のアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入したアミノ酸配列からなり、D-アミノアシラーゼ活性を有するタンパク質。

## 【請求項 3】

次の (a) 又は (b) のいずれかに記載のタンパク質からなる D-アミノアシラーゼをコードする遺伝子。

- (a) 配列番号 2 に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質。
- (b) 配列番号 2 に記載のアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入したアミノ酸配列からなり、D-アミノアシラーゼ活性を有するタンパク質。

## 【請求項 4】

次の (c) 又は (d) の DNA からなるものである請求項 3 記載の遺伝子。

- (c) 配列番号 1 に記載の塩基配列からなる DNA。
- (d) 配列番号 1 に記載の塩基配列に相補的な塩基配列を有する DNA とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ D-アミノアシラーゼ活性を有するタンパク質をコードする DNA。

## 【請求項 5】

N-アセチル-D, L-アミノ酸又は N-アセチル-D-アミノ酸から D-アミノ酸を生成する D-アミノアシラーゼを生産するデフルビバクター (Defluviobacter) 属に属する微生物。

## 【請求項 6】

デフルビバクター・エスピー (Defluviobacter sp.) A131-3 と命名され、FERM P-19045 として寄託された請求項 5 記載の微生物。

## 【請求項 7】

請求項 1 又は 2 記載の D-アミノアシラーゼを生産するものである請求項 5 又は 6 記載の微生物。

【請求項 8】

請求項 5 ～ 7 のいずれか 1 項記載の微生物を培養し、その培養物から D-アミノアシラーゼを採取することを特徴とする請求項 1 又は 2 記載の D-アミノアシラーゼの製造方法。

【請求項 9】

請求項 1 又は 2 記載の D-アミノアシラーゼを N-アセチル-D, L-アミノ酸又は N-アセチル-D-アミノ酸に作用させることを特徴とする D-アミノ酸の製造方法。

## 【書類名】明細書

【発明の名称】D-アミノアシラーゼ

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は、デフルビバクター (Defluviobacter) 属細菌より生産される新規なD-アミノアシラーゼ及び該D-アミノアシラーゼを用いた医薬品、化成品等に利用されるD-アミノ酸の製造法に関する。

## 【背景技術】

## 【0002】

近年、D-アミノ酸が医薬品等へ原料として有効であることが明らかになり、光学的に純度の高いD-アミノ酸を安価に製造することが産業上重要な課題となっている。この方法として一般的に、化学合成したラセミ体を分割する方法が用いられ、特に副生成物や多量の廃溶媒を発生させない酵素法が現在注目されている。

## 【0003】

従来、D-アミノ酸の製造方法として、N-アセチル-D, L-アミノ酸にD-アミノアシラーゼを作用させ、D-アミノ酸を特異的に得る方法が知られていて工業化されている。

D-アミノアシラーゼを産生する微生物として、シュードモナス・エスピー (Pseudomonas sp.) AAA6029株 (例えば、非特許文献1参照)、ストレプトミセス・オリバゼウス (Streptomyces olivaceus) S-62株 (例えば、特許文献1参照)、アルカリゲネス・キシロースオキシダンス・サブスピーシーズ・キシロースオキシダンス (Alcaligenes xylosoxydans subsp. xylosoxydans) A-6株 (例えば、特許文献2参照)等が挙げられ、これらの微生物由来のD-アミノアシラーゼが報告されている。

## 【0004】

しかしながら、これらのD-アミノアシラーゼはN-アセチル-D, L-アミノ酸の種類により反応特性が大きく異なり、公知のD-アミノアシラーゼを用いて広範囲のD-アミノ酸を安価に製造することは困難であった。

また、D-アミノ酸を工業的に製造するために、遺伝子組み換え技術を用いて生産されたD-アミノアシラーゼを使用する方法 (例えば、特許文献3及び4参照) が知られているが、本質的に反応性の低いD-アミノ酸を製造するには多量の酵素が必要であるため、価格や生産量に制限がある。

【特許文献1】特開昭53-59092号公報

【特許文献2】特開平2-234677号公報

【特許文献3】特開2001-185号公報

【特許文献4】特開2001-275688号公報

【非特許文献1】Chemical and Pharmaceutical Bulletin (米国)、1978年、第26巻、p2698

## 【発明の開示】

## 【発明が解決しようとする課題】

## 【0005】

本発明は、従来報告されている酵素では反応性が低いN-アセチル-D-アミノ酸に対して高い活性を有するD-アミノアシラーゼを生産する新規微生物を自然界より見出し、D-アミノ酸を安価に製造する為の新規なD-アミノアシラーゼの製造法及び該新規なD-アミノアシラーゼを用いたD-アミノ酸の製造方法を提供する。また、該新規なD-アミノアシラーゼを産生する微生物を提供することにある。

## 【課題を解決するための手段】

## 【0006】

本発明者等は、上述の問題点を解決すべく鋭意研究を重ねた結果、従来の酵素では反応性が低い基質に対しても良く作用する新規なD-アミノアシラーゼを生産する能力を有するデフルビバクター (Defluviobacter) 属細菌を自然界より見出し、この知見に基づい

て本発明を完成した。

#### 【0007】

すなわち、本発明は、次の酵素学的性質を有するD-アミノアシラーゼを提供するものである。

(a) 作用: N-アセチル-D-アミノ酸に作用しD-アミノ酸を生成する。

(b) 分子量: SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動における測定で、分子量約55,000ダルトンを示す。

(c) 等電点: 変性系2次元電気泳動における測定で、等電点5.3を示す。

(d) 基質特異性: N-アセチル-D-アミノ酸に作用し、特にN-アセチル-D-バリンに良く作用し、N-アセチル-L-アミノ酸に作用しない。基質として、N-アセチル-D-バリン、N-アセチル-D-ロイシン、N-アセチル-D-メチオニン、N-アセチル-D-トリプトファン、N-アセチル-D-フェニルアラニン、N-アセチル-D-チロシンに作用し、N-アセチル-L-バリン、N-アセチル-L-ロイシン、N-アセチル-L-メチオニン、N-アセチル-L-トリプトファン、N-アセチル-L-フェニルアラニン、N-アセチル-L-チロシンには作用しない。

(e) 温度安定性: pH8.5で1日加温した場合、4℃から30℃まで比較的安定である。

(f) 至適温度: pH8で30分反応させた場合、37℃において作用が至適である。

(g) pH安定性: 温度30℃で1日加温した場合、pH9付近で安定であり、pH6付近からpH11付近でも比較的安定である。

(h) 至適pH: 温度37℃で反応させた場合、pH8からpH8.5付近で最も良く作用する。

(i) 金属イオンの影響: 1mmol/Lの $Mn^{2+}$ 、 $Co^{2+}$ 、 $Ni^{2+}$ 、 $Cu^{2+}$ 、 $Zn^{2+}$ で活性が阻害される。

(j) 阻害剤の影響: 5mmol/Lのジチオスレイトール、2-メルカプトエタノール、o-フェナントリン、L-システインで活性が阻害される。

#### 【0008】

また、本発明は、次の(a)又は(b)のいずれかに記載のタンパク質からなるD-アミノアシラーゼ及び当該D-アミノアシラーゼをコードする遺伝子を提供するものである。

(a) 配列番号2に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質。

(b) 配列番号2に記載のアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入したアミノ酸配列からなり、D-アミノアシラーゼ活性を有するタンパク質。

#### 【0009】

また本発明は、N-アセチル-D, L-アミノ酸又はN-アセチル-D-アミノ酸をD-アミノ酸に効率的に変換するD-アミノアシラーゼを産生するデフルビバクター (Defluviobacter) 属に属する微生物を提供するものである。

また、本発明は、該微生物を培養し、その培養物から、前記のD-アミノアシラーゼを採取することを特徴とするD-アミノアシラーゼの製造方法を提供するものである。

また、本発明は、当該D-アミノアシラーゼをN-アセチル-D, L-アミノ酸又はN-アセチル-D-アミノ酸に作用させることを特徴とするD-アミノ酸の製造方法を提供するものである。

#### 【発明の効果】

#### 【0010】

本発明により、デフルビバクター (Defluviobacter) 属に属する微生物より得られた新規なD-アミノアシラーゼは、基質特異性が高く例えば、N-アセチル-D, L-バリン、N-アセチル-D, L-メチオニン、N-アセチル-D, L-トリプトファン、N-アセチル-D, L-ロイシン、N-アセチル-D, L-フェニルアラニン、N-アセチル-D, L-チロシン等よりD-アミノ酸を簡便かつ効率的さらに安価に製造することができる。

## 【発明を実施するための最良の形態】

## 【0011】

本発明は、新規なD-アミノアシラーゼを産生する能力を有する微生物を自然界から見出し、新規なD-アミノアシラーゼの諸性質並びにその遺伝子を明らかにし、D-アミノ酸の製造に有効であることを明らかにする事により確立された。

## 【0012】

すなわち、本発明の新規なD-アミノアシラーゼを生産する微生物としては、上記の本発明D-アミノアシラーゼを生産するものである限り特に限定されないが、本発明で見出した新規なD-アミノアシラーゼ生産菌の一例は、第一化学薬品株式会社・岩手工場内の土壤中より単離されたデフルビバクター (Defluviobacter) 属に属する微生物であり、例えば、デフルビバクター エスピー A131-3 (Defluviobacter sp. A131-3) 等が挙げられる。当該A131-3株は次のような菌学的性質を有する。

## 【0013】

(形態的所見)

1. 細胞形態：桿菌 (0.6 ~ 0.7 × 1.5 ~ 2.0 μm)
2. グラム染色：陰性
3. 孢子形成：なし
4. 運動性：あり
5. 鞭毛：あり
6. 普通寒天培地：円形、全縁滑らか、低凸状、光沢あり、くすんだ灰色から黄淡色

## 【0014】

(生理学的性質)

1. カタラーゼ生産：陽性
2. オキシダーゼ生産：陽性
3. 酸/ガス生産 (グルコース)：陰性
4. O/Fテスト (グルコース)：陰性
5. 嫌気性生育：しない
6. 好気性生育：絶対好気性

## 【0015】

(生物学的性状)

API 20 NE 同定システム (bioMérieux France) を使い、その測定方法に従い生化学的性状試験を実施した。

1. 硝酸塩還元：陰性
2. インドール生産：陰性
3. ブドウ糖 酸性化：陰性
4. アルギニンジヒドラーゼ：陰性
5. ウレアーゼ：陰性
6. エスクリン加水分解：陰性
7. ゼラチン加水分解：陰性
8. β-ガラクトシダーゼ：陰性
9. チトクロームオキシダーゼ：陽性

## 【0016】

(資化性試験)

1. ブドウ糖：陽性
2. L-アラビノース：陰性
3. D-マンノース：陽性
4. D-マンニトール：陰性
5. N-アセチル-D-グルコサミン：陽性
6. マルトース：陰性
7. グルコン酸カリウム：陽性

8. n-カプリン酸: 陰性
9. アジピン酸: 陰性
10. DL-リンゴ酸: 陽性
11. クエン酸ナトリウム: 陰性
12. 酢酸フェニル: 陰性
13. 2, 4-ジクロロフェノール: 陰性
14. フェノール: 陰性

## 【0017】

(脂肪酸組成分析)

脂肪酸組成測定には、ガスクロマトグラフィーシステム HP 6890 (Hewlett-Packard, CA, USA) を用い、菌種データ照合は Sherlock Microbial Identification System (MIDI) を用い、データベースは MIS Standard Libraries (MIDI) の TSB A (Version 4.0) を用いた。

1. 要脂肪酸: C<sub>18:1ω7c</sub> の直鎖・モノ不飽和脂肪酸
2. ヒドロキシ脂肪酸: C<sub>12:03OH</sub>

## 【0018】

(ユビキノン分析)

高速液体クロマトグラフを用いユビキノン標準試料のリテンションタイムの比較から分子種の同定を行った。

1. 主要ユビキノン系: Q-10

## 【0019】

(細胞壁アミノ酸分析)

高性能薄層プレート HPTLC (Merck, NJ, USA) を用いて、細胞壁ペプチドグルカンに含まれる特異的アミノ酸を対照として展開し、特異的アミノ酸の検出を行った。

細胞壁アミノ酸: meso-ジアミノピメリン酸

## 【0020】

(16S rDNA-Full塩基配列解析)

BLASTを用いてDNA塩基配列データベース (GenBank) に対して相同性検索を行った。

1. デフルビバクター ルサチエンシス (*Defluviobacter lusatiensis* DSM11099) と 99.9% の 16S rDNA 相同性

## 【0021】

以上の生化学的および菌学的諸性質から、自然界より新たに発見した微生物はデフルビバクター (*Defluviobacter*) 属の細菌に分類されたが、同様の性質を持つ微生物としてはデフルビバクター (*Defluviobacter*) 属の *Defluviobacter lusatiensis* DSM11099 が報告されている (*Defluviobacter lusatie* gen. nov., sp. nov., a new chlorophenol-degrading member of the α-2 subgroup of proteobacteria. Syst. Appl. Microbiol., 1999, 22, 197-204.). しかし、公知のデフルビバクター (*Defluviobacter*) 属の細菌が D-アミノアシラーゼを産生することの記載はなく、デフルビバクター (*Defluviobacter*) 属の微生物が D-アミノアシラーゼを産生する能力を持つことは、本発明で初めて明らかにされた。なお、本発明で発見した菌株はデフルビバクター・エスピー A131-3 (*Defluviobacter* sp. A131-3) と命名し、独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センターに FERM P-19045 として寄託した。

## 【0022】

そして、本発明で見出した新規な D-アミノアシラーゼを得るためには、デフルビバクター属の細菌、例えばデフルビバクター・エスピー A131-3 (*Defluviobacter* sp. A131-3) 株を親株として人工的に変異処理及び突然変異、又は組み換え DNA 操作などの公知の一般的な酵素の生産性及び性質を向上させる方法で得られた遺伝子組み換え体や、その変異株や改良株を用いることも可能である。

## 【0023】



本発明の新規なD-アミノアシラーゼは、当該微生物を適当な培地に接種し培養することにより得ることができる。

#### 【0024】

ここで使用される培地は、通常の微生物の培地に用いられ、当該微生物が生育し新規なD-アミノアシラーゼが生産されるものであれば、特に限定されないが、該培地中には、資化し得る窒素源、炭素源、無機塩類を適量含有せしめておくことが好ましい。

#### 【0025】

窒素源、炭素源、無機塩類は特に制限されない。

例えば窒素源として、肉エキス、酵母エキス、ペプトン等が挙げられる。炭素源として、グルコース、フルクトース、ショ糖、グリセリン、酢酸等が挙げられる。無機塩類として、リン酸水素二ナトリウム、リン酸二水素カリウム、硫酸マグネシウム、硝酸アンモニウム、硫酸鉄、硫酸亜鉛等が挙げられる。

また、本発明のD-アミノアシラーゼの生成に誘導物質等は特に必要ないが、D-アミノアシラーゼ高産生化のために、誘導化物質として、N-アセチル-D或いはD、L-アミノ酸等のアシル化アミノ酸誘導体を培地中に0.01~0.5重量%（以下単に%と記載する）程度添加することが望ましく、特に、N-アセチル-D-バリン、N-アセチル-D-ロイシン等が誘導物質として有効である。

#### 【0026】

培地のpHは、菌が生育可能な範囲であればいずれのpH範囲でも良いが、特に7~9程度が好ましく、培養温度は15~40℃、より好ましくは25~37℃である。培養時間は、20~48時間液体培地を用い振とう培養することが好ましいが、用いる培地によって時間は変動する。また、同様の培地に寒天を加えた固体培地でも菌の培養を行うことが可能である。

#### 【0027】

このような方法によって得られた微生物菌体中に、D-アミノアシラーゼが産生される。

培養物からの目的物質であるD-アミノアシラーゼの採取及び精製は、一般の酵素の採取及び精製手段に準じて行うことができる。すなわち、培養物を遠心又はろ過などによって菌体を分離し、機械的磨砕又は超音波破碎等により菌体を破碎し、その破碎液から通常の分離手段、例えば、疎水クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、ハイドロキシアパタイトクロマトグラフィー、ゲルろ過クロマトグラフィー等により採取、精製する方法が挙げられる。

#### 【0028】

このようにして得られた、本発明D-アミノアシラーゼの酵素学的性質及びアミノ酸配列は次のとおりである。また、本発明D-アミノアシラーゼ遺伝子の塩基配列も以下に示す。

#### 【0029】

(1) 作用：N-アセチル-D-アミノ酸に作用しD-アミノ酸を生成する。

(2) 分子量：定法に則り、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動（第一化学薬品（株）製、PAGミニ「第一」10/20）を行い、タンパク質分子量マーカー（第一化学薬品（株）製、タンパク質分子量マーカー「第一」・III）の移動度より分子量を求めた結果、約55,000ダルトンを示す。

(3) 等電点：2次元電気泳動法に則り、変性系2次元電気泳動（第一化学薬品製、IPGチューブゲル「第一」4-10及び、PAGラージ「第一」2D-10/20）を行い、2D-タンパク質等電点マーカー（第一化学薬品（株）製、2D-タンパク質等電点マーカー「第一」）の移動度より等電点を求めた結果、pI値5.3を示す。

(4) 基質特異性：以下のN-アセチル-D-アミノ酸及びN-アセチル-L-アミノ酸を基質として、D-アミノ酸オキシダーゼ或いはL-アミノ酸オキシダーゼを組み合わせる方法で本発明のアシラーゼの基質特異性を確認した。以下のN-アセチル-D-アミノ酸に作用し、N-アセチル-L-アミノ酸には作用しない。N-アセチル-D-アミノ酸

としてN-アセチル-L-バリンに最も良く作用し、N-アセチル-D-ロイシン、N-アセチル-D-メチオニン、N-アセチル-D-トリプトファン、N-アセチル-D-フェニルアラニン、N-アセチル-D-チロシンにも作用する。N-アセチル-L-バリン、N-アセチル-L-ロイシン、N-アセチル-L-メチオニン、N-アセチル-L-トリプトファン、N-アセチル-L-フェニルアラニン、N-アセチル-L-チロシンには作用しない。

尚、L-アミノ酸の測定は、下記に示す活性測定法で、D-アミノ酸オキシダーゼの代わりにL-アミノ酸のオキシダーゼを使用する。

(5) 温度安定性: pH8.5で4℃、25℃、30℃、40℃、50℃で1日加温し、下記の活性測定法に則り残存する酵素活性を測定した結果、4℃から30℃まで比較的安定である。

(6) 至適温度: pH8で4℃、25℃、30℃、37℃、40℃で下記の活性測定法に則り酵素活性を測定した結果、37℃において作用が至適である。

(7) pH安定性: 温度30℃でpH4から12で1日間加温後、下記の活性測定法に則り残存する酵素活性を測定した結果、pH9付近で安定であり、pH6付近からpH11付近までは比較的安定である。

(8) 至適pH: 温度37℃でpH6から12で下記の活性測定法に則り酵素活性を測定した結果、pH8からpH8.5付近で最も良く作用する。

(9) 金属イオンの影響: 酵素液に金属イオンとして、塩化カルシウム・2水和物、塩化鉄(III)・6水和物、塩化ナトリウム、塩化コバルト(II)・6水和物、塩化カリウム、塩化ニッケル・6水和物、塩化マグネシウム・6水和物、硫酸銅(II)・5水和物、塩化マンガン(II)・4水和物、塩化亜鉛、モリブデン酸ナトリウムを、1mmol/Lになるように添加して、N-アセチル-D, L-バリンと反応させ、生成されたD-バリン量をHPLCで測定した結果、1mmol/Lの $Mn^{2+}$ 、 $Co^{2+}$ 、 $Ni^{2+}$ 、 $Cu^{2+}$ 、 $Zn^{2+}$ で活性が阻害される。

(10) 阻害剤の影響: 酵素液に阻害剤として、エチレンジアミン四酢酸、2-メルカプトエタノール、N-エチルマレイミド、o-フェナントリン、L-システイン、ヨードアセトアミド、ジチオスレイトールを、5mmol/Lになるように添加して、N-アセチル-D, L-バリンと反応させ、生成したD-バリン量をHPLCで測定した結果、5mmol/Lのジチオスレイトール、2-メルカプトエタノール、o-フェナントリン、L-システインで活性が阻害される。

#### 【0030】

本発明D-アミノアシラーゼ遺伝子の塩基配列及びD-アミノアシラーゼタンパク質アミノ酸配列は、以下の公知の方法により決定した。

精製された酵素のN末及び内部アミノ酸配列から考えられるDNAをすべて包含したミックスプライマーより、デフルビバクター・エスピー A131-3 (Defluviobacter sp. A131-3) より抽出精製したDNAを用い、PCR法の反応結果から、得られた増幅産物をクローニングした結果、本発明D-アミノアシラーゼ遺伝子の塩基配列は配列番号1に記載の塩基配列と決定した。また、その塩基配列から、本発明D-アミノアシラーゼタンパク質は配列番号2に記載のアミノ酸配列を有することが判明した。

#### 【0031】

本発明のD-アミノアシラーゼには、(a) 配列番号2に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質だけでなく、(b) 配列番号2に記載のアミノ酸配列において、1もしくは数個のアミノ酸配列が置換、欠失、挿入したアミノ酸配列からなり、D-アミノアシラーゼ活性を有するタンパク質が含まれる。ここで、上記の1もしくは数個のアミノ酸配列が置換、欠失、挿入されたアミノ酸配列には、配列番号2のアミノ酸配列と80%以上、好ましくは90%以上、さらに好ましくは95%以上の相同性を有するアミノ酸配列が含まれる。

#### 【0032】

本発明のD-アミノアシラーゼ遺伝子としては、前記(a)又は(b)のタンパク質を

コードする遺伝子であれば制限されないが、(c) 配列番号 1 に記載の塩基配列からなる DNA だけでなく、(d) 配列番号 1 に記載の塩基配列に相補的な塩基配列を有する DNA とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ D-アミノアシラーゼ活性を有するタンパク質をコードする DNA が好ましい。ここで、ストリンジェントな条件としては、例えば 0.1% SDS を含む 0.2×SSC 中 50℃ の条件、0.1% SDS を含む 1×SSC 中 60℃ の条件を挙げることができる。また、上記のストリンジェントな条件下でハイブリダイズする DNA には、配列番号 1 に記載の塩基配列と 80% 以上、好ましくは 90% 以上、さらに好ましくは 95% 以上の相同性を有する DNA が含まれる。

#### 【0033】

アミノ酸オキシダーゼを用いたアシラーゼ活性の測定方法：10 mL の 0.1 mol/L リン酸緩衝液 pH 8 に 4-Aminoantipyrine 0.61 mg (ナカライテスク (株) 製、Code:01907-52)、N-Ethyl-N-(2-hydroxy-3-sulfoethyl)-3-methylaniline, sodium, salt, dihydrate 3.22 mg (Dojindo Laboratories 製、Code:OC13)、PEROXIDASE 30 unit (SIGMA 社製、Code:P-6782)、D-AMINO ACID OXIDASE 1 unit (SIGMA 社製、Code:A-9128) 又は L-AMINO ACID OXIDASE 1 unit (SIGMA 社製、Code:A-5147)、を溶解して発色試薬とした。この発色試薬 500  $\mu$ L と 100 mmol/L の N-アセチル-D, L-バリン 100  $\mu$ L、測定酵素サンプル 100  $\mu$ L、0.1 mol/L リン酸緩衝液 (pH 8) 300  $\mu$ L を含む 1 mL の反応液を 37℃ で 30 分間加温後、分光光度計を用い 555 nm の吸光度値を測定し、D-バリンを用いて作成した検量線から酵素活性を求めた。

尚、1 U は 1 分間に 1  $\mu$ mol の D-バリンの生成を触媒する酵素量とした。

#### 【0034】

HPLC を用いたアシラーゼの測定方法：Inertsil ODS-2 (GL サイエンス (株) 製) カラムを用い、0.015% 1-ペンタンスルホン酸ナトリウム (pH 2.5) 80:アセトニトリル 20 緩衝液を用い、流速 0.5 mL/分、検出 230 nm、カラム温度 30℃ で分析した。酵素活性は検出されたアセチル体と遊離体の面積比から、無添加を 100 として分割率を求め、相対活性値で表す。

#### 【0035】

得られた新規な D-アミノアシラーゼは、N-アセチル-D-アミノ酸に特異的に作用し、N-アセチル-L-アミノ酸には作用しないので、N-アセチル-D-アミノ酸から D-アミノ酸を製造するために利用できるが、N-アセチル-D, L-アミノ酸から D-アミノ酸を分割分離するためにも使用される。すなわち、D, L-アミノ酸をアセチル化して N-アセチル-D, L-アミノ酸とし、次に D-アミノアシラーゼを加えて N-アセチル-D-アミノ酸を加水分解し D-アミノ酸を生成する事により、D-アミノ酸と L-アミノ酸を分離することが可能である。なお、N-アセチル-D-アミノ酸のみを用いれば、D-アミノ酸だけが得られる。

#### 【0036】

D-アミノアシラーゼを N-アセチル-D, L-アミノ酸又は N-アセチル-D-アミノ酸に作用させる場合、D-アミノアシラーゼ添加量は、通常 1~1000 U/mL 基質溶液の範囲で、好ましくは 50~500 U/mL 基質溶液である。また、N-アセチル-D, L-アミノ酸又は N-アセチル-D-アミノ酸量は 1~40 重量% (以下%と記載する)、さらには 5~25% 水溶液とすることが好ましい。

反応温度は 10~50℃、さらには 15~45℃ であるのが好ましく、反応は pH 6.5~10.5、さらには 7.5~10 であるのが好ましい。また、反応時間は 0.2~10 日間、さらには 1~5 日間であるのが好ましい。

反応液からの D-アミノ酸の分離回収は、例えば、濃縮、等電点、沈殿、イオン交換樹脂処理、膜分離等の公知の方法で行なわれる。

#### 【実施例】

#### 【0037】

以下に実施例を挙げて本発明を詳細に説明するが、本発明はこれらの実施例に制限されるものではない。

## 【0038】

実施例1 デフルビバクター エスピー A131-3株の単離

第一化学薬品株式会社岩手工場内の土壌を採取し、次法により菌体を採取した。

培地として、硝酸アンモニウム0.2%、リン酸二水素カリウム0.2%、リン酸水素二ナトリウム0.1%、硫酸マグネシウム・7水塩0.05%、誘導物質N-アセチル-D, L-バリン0.2%を含むpH8.5の培地に少量の土壌を添加し30℃で試験管を用いて振盪培養した。次に同様の培地で寒天2%を含む同一培地組成の平板培地上に培養液をプレートアウトし、30℃で培養後生育した微生物を分離した。

分離した微生物を再度上記と同一組成の培地を用いて試験管で振盪培養し、以下の2つの方法で従来とは異なるD-アミノアシラーゼを生産する能力を有する微生物を選抜した。

## 【0039】

(1) D-アミノアシラーゼ活性測定法: 5mLの0.1mol/Lリン酸緩衝液pH8に4-Aminoantipyrine 0.61mg (ナカライテスク(株)製、Code:01907-52)、N-Ethyl-N-(2-hydroxy-3-sulfopropyl)-3-methylaniline, sodium, salt, dihydrate 3.22mg (Dojindo Laboratories製、Code:OC13)、PEROXIDASE 30unit (SIGMA社製、Code:P-6782)、D-AMINO ACID OXIDASE 1unit (SIGMA社製、Code:A-9128)、を溶解して発色試薬とした。この発色試薬100μLと、100mmol/LのN-アセチル-D, L-バリン100μLと上記培養液を遠心分離し再懸濁を行った菌体液100μLをマイクロプレートのセル中で混和し37℃で1時間反応後、マイクロプレートリーダーを用いて555nmの吸光度を測定した。発色が確認された菌株についてD-アミノアシラーゼ活性を持つ菌株として選んだ。

## 【0040】

(2) HPLC分析による生産菌の選抜: 次に上記の発色法でN-アセチル-D, L-バリンに対して強い活性を示すことが確認された菌株について、下記のHPLCによる分析を行った。

カラム: SUMICHIRAI OA-5000 (5μm, 4.6mmφ×150mm)、移動相: 2mmol/L硫酸銅: アセトニトリル=90:10、温度: 40℃、流速: 0.8mL/min、検出: 230nmの条件で、培養後遠心分離した菌体と100mmol/LのN-アセチル-D, L-バリンの反応液30μLを用いて、N-アセチル-D, L-アミノ酸の分解とD-アミノ酸あるいはL-アミノ酸の生成を、N-アセチル-D-バリン, N-アセチル-L-バリンとD-バリン, L-バリンが溶出される時間のピーク面積より分析した。その結果、発色法で選抜した菌株はいずれもN-アセチル-D-バリンが速やかに減少し、N-アセチル-D-バリンの減少量に相当するD-バリンの増加が認められた。

次に、各種のN-アセチル-D, L-アミノ酸との反応を比較して、D-アミノ酸に特異性が高く、さらに既存のD-アミノアシラーゼとは異なりD-バリンに対する反応性が優れている酵素を生産する微生物を新規なD-アミノアシラーゼ生産菌として選抜した。

このような方法を経て得られた菌株は、前記の菌学的性質を有するものであった。この菌株をデフルビバクター エスピー A131-3株と命名した。

## 【0041】

実施例2 D-アミノアシラーゼの製造

デフルビバクター エスピー A131-3株を、実施例1で使用した培地に粉末酵母エキスD-3 0.1% (和光純薬工業(株)製、Code:390-00531)、ポリペプトン0.1% (和光純薬工業(株)製、Code:394-00115)、塩化ナトリウム0.05%を添加したpH8の培地20Lで、ジャーファーメンターを用い30℃、150r/min、27時間通気攪拌培養した。培養終了時の濁度(ABS660nm)は1.52で、pH7.75であった。

培養後、冷却遠心分離機(日立工機(株)製)を用い、4000r/minで60分間遠心分離を行い集菌した。集菌した菌体を、20mmol/Lトリス-塩酸(pH8)緩衝液で洗浄した後、再度遠心分離機により菌体を集めて112gの菌体を得た。得られた菌体は、

-80℃で凍結保存した。

凍結保存菌体を融解し、菌体量の3倍の20mmol/Lトリス-塩酸(pH8)緩衝液340mLで懸濁後、低温室内(4℃)で攪拌しながら投入式超音波破碎機を用い、120分間超音波破碎を行った。破碎後、高速冷却遠心機(日立工機(株)製)で8000r/min、4℃、60分間遠心分離後、上清液365mLを得た。これを粗酵素液とした。

なお、本菌株は培養時にN-アセチル-D, L-バリンを添加しなくともD-アミノアシラーゼを産生したが、N-アセチル-D, L-バリンを添加することにより、その酵素生産量を2倍以上に増加することが可能であった。

#### 【0042】

##### 実施例3 D-アミノアシラーゼの精製

粗酵素液を透析チューブに詰め、0.1mol/L塩化ナトリウム含有20mmol/Lトリス-塩酸(pH8)緩衝液中に投入し、低温室内(4℃)で攪拌を行いながら、数回緩衝液を交換し一昼夜透析を行った。透析終了後、高速冷却遠心機(日立工機(株)製)で8000r/min、4℃、60分間遠心分離後上清液342mLを得た。

この、透析終了液の1/3量について以下の精製を行った。透析の終了した114mLを、予め0.1mol/L塩化ナトリウム含有20mmol/Lトリス-塩酸(pH8)緩衝液で平衡化したTOYOPEARL Super Q-650Mカラム(東ソー(株)製)(4.4cmφ×37.5cm)に供して酵素を吸着させた。次に0.1mol/L塩化ナトリウム含有20mmol/Lトリス-塩酸(pH8)緩衝液1500mLでカラムを洗浄し、続いて0.1mol/L塩化ナトリウム含有20mmol/Lトリス-塩酸(pH8)緩衝液5700mLと0.3mol/L塩化ナトリウム含有20mmol/Lトリス-塩酸(pH8)緩衝液5700mLを用いて直線濃度勾配法で酵素を溶出した。カラム流下後は25mLずつ分取して、各フラクションのタンパク量(280nmの吸光度)とD-アミノアシラーゼ活性(下記の酵素活性測定法を参照)を測定し、活性画分を回収した。

各フラクションのD-アミノアシラーゼ酵素活性は、10mLの0.1mol/Lリン酸緩衝液pH8に4-Aminoantipyrine 0.61mg(ナカライテスク(株)製、Code:01907-52)、N-Ethyl-N-(2-hydroxy-3-sulfopropyl)-3-methylaniline, sodium, salt, dihydrate 3.22mg(Dojindo Laboratories製、Code:OC13)、PEROXIDASE 30unit(SIGMA社製、Code:P-6782)、D-AMINO ACID OXIDASE 1unit(SIGMA社製、Code:A-9128)、を溶解して発色試薬とした。この発色試薬500μLと100mmol/LのN-アセチル-D, L-バリン100μL、測定酵素サンプル100μL、0.1mol/Lリン酸緩衝液(pH8)300μLを含む1mLの反応液を37℃で30分間加温後、分光光度計を用い555nmの吸光度値を測定した。

#### 【0043】

TOYOPEARL Super Q-650Mクロマトグラフィーで、D-アミノアシラーゼ活性が認められたフラクション画分(968mL)をビバフロー50(ザルトリウス(株)製)分画分子量10000の限外ろ過膜を用いて濃縮し、さらに、5mmol/Lリン酸緩衝液(pH7.2)で透析した。

この透析した酵素液160mLを予め5mmol/Lリン酸緩衝液(pH7.2)で平衡化したBIO-GEL HT(BIO-RAD社製)ハイドロキシアパタイトカラム(2.2cmφ×20cm)に吸着させた。

次に、5mmol/Lリン酸緩衝液(pH7.2)350mLでカラムを洗浄し、続いて5mmol/Lリン酸緩衝液(pH7.2)750mLと200mmol/Lリン酸緩衝液(pH7.2)750mLを用いて直線濃度勾配法で酵素を溶出した。カラム流下後は25mLずつ分取して、各フラクションのタンパク量とD-アミノアシラーゼ活性を測定し、活性画分を回収した。

BIO-GEL HT(BIO-RAD社製)によるハイドロキシアパタイトクロマトグラフィーで得られた活性画分280mLを、ビバフロー50(ザルトリウス(株)製)分画分子量10000の限外ろ過膜を用いて、20mLに濃縮した。

この濃縮液を、予め0.3mol/L塩化ナトリウム含有20mmol/Lトリス-塩酸(pH8)緩衝液で平衡化したSuperdex 200p.gカラム(Pharmacia Biotech社製

) (2. 2 cm  $\phi$   $\times$  6.6 cm) に供し、同緩衝液を 1.5 mL/分の流速で流した。カラム流下後は 1.0 mL ずつ分取して、各フラクションのタンパク量と D-アミノアシラーゼ活性を測定した。

#### 【0044】

D-アミノアシラーゼ活性が確認された画分の少量を SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) 分析に供し、不純蛋白質が混在しないことを確認した。

SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法は、PAGミニ[第一]10/20 (第一化学薬品 (株) 製) を用い、第一化学薬品 (株) の SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動操作法に則って行った。SDS-サンプル処理液 (第一化学薬品 (株) 製) 50  $\mu$ L と精製フラクション 50  $\mu$ L を同量混合し、5 分間煮沸処理を行った。

PAGミニ[第一]10/20ゲルに、煮沸処理を行ったサンプルを 20  $\mu$ L 供し、40 mA の定電流で電気泳動を行い、ページブルー 83 染色液 (第一化学薬品 (株) 製) で染色後、目的の D-アミノアシラーゼと推定される蛋白質のバンドを確認した。

比活性 (蛋白質量に対する酵素活性の比率) 及び電気泳動で純度が高いことを確認した。この活性画分を集め、ビバフロー 50 (ザルトリウス (株) 製) 分画分子量 10000 の限外ろ過膜、さらにビバポア 10/20 (ザルトリウス (株) 製) 分画分子量 7500 の限外ろ過膜を用いて濃縮操作を行い、精製酵素として 2.8 mL 得た。

#### 【0045】

本精製法による酵素精製収率は表 1 のとおりであった。

#### 【0046】

##### 【表 1】

工程名	液量 (mL)	総タンパク量 (mg)	総活性量 (KU)	比活性 (U/mg)	活性回収率 (%)
破碎遠心上清	114	4605	2707	588	100
SuperQ-650M	968	47	1334	28300	49
BIO-GEL HT	280	27	1125	41600	42
Superdex200	346	25	1003	40100	37
濃縮液	28	23	953	41400	35

#### 【0047】

##### 実施例 4 精製酵素の酵素学的性質

実施例 3 で得られたデフルビバクター エスピー A131-3 株由来の D-アミノアシラーゼ (以下、本酵素と記載することもある) の酵素学的性質を、以下の方法で測定した。

#### 【0048】

1. 分子量の測定は、前述の SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法 (第一化学薬品 (株) 製、PAGミニ「第一」10/20) で測定を行った。タンパク質分子量マーカー (第一化学薬品 (株) 製、タンパク質分子量マーカー「第一」・III) フォスフォリラーゼ b (97, 400 ダルトン)、ウシ血清アルブミン (66, 267 ダルトン)、アルドラーゼ (42, 400 ダルトン)、カルボニックアンヒドラーゼ (30, 000 ダルトン)、トリプシンインヒビター (20, 100 ダルトン)、リゾチーム (14, 400 ダルトン) の移動度より求めた分子量は約 55, 000 ダルトンであった (図 1)。

#### 【0049】

2. ゲルろ過による分子量の測定は、Superdex 200 pg HR10/30 (Pharmacia Biotech 社製) (1 cm  $\phi$   $\times$  30 cm) により、0.3 mol/L 塩化ナトリウム含有 20 mmol/L トリス-塩酸 (pH8) 緩衝液で流速 1 mL/min、検出 280 nm で分析を行った。分子量マーカーには LMW GEL FILTRATION CALIBRATION KIT (PHARMACIA BIOTECH 社製) Bovine Serum Albumin (67, 000 ダルトン)、Ovalbumin (43, 000 ダルトン)、Chymotrypsinogen

enA (25,000ダルトン)、Ribonuclease A (13,700ダルトン)を用い、分子量と溶出時間との関係を求めた。本酵素を同じ条件で分析し算出した分子量は約56,000ダルトンであった。

#### 【0050】

3. タンパク質等電点は、2次元電気泳動法に則り、変性系2次元電気泳動(第一化学薬品(株)製、IPGチューブゲル「第一」4-10及びPAGラージ「第一」2D-10/20)を用いて測定した。2D-タンパク質等電点マーカー(第一化学薬品(株)製、2D-タンパク質等電点マーカー「第一」) pI値5.1、5.2、5.3、5.4、5.7、6.0、6.2、6.4、6.5、6.7、6.8、7.0、7.1の移動度を基準として求めた本酵素のpI値は5.3であった。

#### 【0051】

4. 基質特異性は、前述したD-及びL-アミノ酸オキシダーゼ発色試薬を用いた活性測定法に則り検討した。すなわち、初めに200  $\mu\text{mol/L}$ 、150  $\mu\text{mol/L}$ 、100  $\mu\text{mol/L}$ 、50  $\mu\text{mol/L}$ 、20  $\mu\text{mol/L}$ 、10  $\mu\text{mol/L}$ の各D-アミノ酸及びL-アミノ酸を基質として用いて反応し、得られた555nmの吸光度値と基質濃度の関係から酵素活性の検量線を作成した。

次に同様の発色試薬を用い基質として、100mmol/L N-アセチル-D, L-バリン、N-アセチル-D, L-メチオニン、N-アセチル-D, L-トリプトファン、N-アセチル-D, L-ロイシン、N-アセチル-D, L-フェニルアラニン、N-アセチル-D, L-チロシン、N-アセチル-D, L-グルタミン酸を用いて、以下の方法で各アセチルアミノ酸に対する反応を調べた。

すなわち、10mLの0.1mol/Lリン酸緩衝液pH8に4-Aminoantipyrine 0.61mg(ナカライテスク(株)製、Code:01907-52)、N-Ethyl-N-(2-hydroxy-3-sulfopropyl)-3-methylaniline, sodium, salt, dihydrate 3.22mg(Dojindo Laboratories製、Code:OC13)、PEROXIDASE 30unit (SIGMA社製、Code:P-6782)、D-AMINO ACID OXIDASE 1unit (SIGMA社製、Code:A-9128)又はL-AMINO ACID OXIDASE 1unit (SIGMA社製、Code:A-5147)、を溶解して発色試薬とし、この発色試薬500  $\mu\text{L}$ と100mmol/Lの各アセチルアミノ酸基質溶液100  $\mu\text{L}$ 、一定濃度の本酵素液100  $\mu\text{L}$ 、0.1mol/Lリン酸緩衝液(pH8)300  $\mu\text{L}$ を含む1mLの反応液を37℃で30分間加温後、分光光度計を用い555nmの吸光度値を測定し、各D-アミノ酸及びL-アミノ酸を用いて作成した検量線から酵素活性量を求めた。

尚、1Uは1分間に1  $\mu\text{mol/L}$ の各D-アミノ酸及びL-アミノ酸の生成を触媒する酵素量とし、上記で求めたD-アミノ酸及びL-アミノ酸の濃度との関係式から算出した。

。基質特異性は、N-アセチル-D-メチオニンを100にした場合と、N-アセチル-D-バリンを100にした場合の相対活性で表2に示した。

#### 【0052】



【表 2】

基 質	相対活性(%対Met)	相対活性(%対Val)
N-Ac-D-Val	762	100
N-Ac-D-Met	100	13
N-Ac-D-Trp	1.1	0.2
N-Ac-D-Leu	555	73
N-Ac-D-Phe	37	4.8
N-Ac-D-Tyr	8.4	1.1
N-Ac-D-Glu	0	0
N-Ac-L-Val	0	0
N-Ac-L-Met	0	0
N-Ac-L-Trp	0	0
N-Ac-L-Leu	0	0
N-Ac-L-Phe	0	0
N-Ac-L-Tyr	0	0
N-Ac-L-Glu	0	0

## 【0053】

N-アセチル-D-アミノ酸またはN-アセチル-L-アミノ酸を用いて反応を確認した結果、N-アセチル-D-アミノ酸のみに作用し、N-アセチル-L-アミノ酸にはまったく作用しなかった。N-アセチル-D-アミノ酸の中ではN-アセチル-D-バリンに最も良く作用し、N-アセチル-D-ロイシン、N-アセチル-D-メチオニン、N-アセチル-D-トリプトファン、N-アセチル-D-フェニルアラニン、N-アセチル-D-チロシンにも作用した。しかし、N-アセチル-D-グルタミン酸には作用しなかった。N-アセチル-L-アミノ酸として、N-アセチル-L-バリン、N-アセチル-L-ロイシン、N-アセチル-L-メチオニン、N-アセチル-L-トリプトファン、N-アセチル-L-フェニルアラニン、N-アセチル-L-チロシン及びN-アセチル-L-グルタミン酸のN-アセチル-L-アミノ酸には作用しなかった。

## 【0054】

5. 温度安定性は、本酵素液をpH8.5で4℃、25℃、30℃、40℃、50℃で1日加温し、前述のD-アミノ酸オキシダーゼを用いるD-アミノアシラーゼ活性測定法に則り加温処理後の残存活性を測定して確認した。本酵素の温度安定性を図2に示す。本酵素は、4℃から30℃までは安定であった。

## 【0055】

6. 至適温度は、本酵素液をpH8で4℃、25℃、30℃、37℃、40℃で前述のD-アミノ酸オキシダーゼを用いるD-アミノアシラーゼ活性測定法に則り活性測定を行って確認した。本酵素の至適温度を図3に示す。本酵素は、37℃において作用が至適であった。

## 【0056】

7. pH安定性は、本酵素をpH4から12で温度30℃1日加温後、前述のD-アミノ酸オキシダーゼを用いるD-アミノアシラーゼ活性測定法に則りpH処理後の残存活性を測定して確認した。本酵素のpH安定性を図4に示す。結果本酵素は、pH9付近で安定であり、pH6付近からpH11付近までも比較的安定であった。

## 【0057】

8. 至適pHは、本酵素を温度37℃でpH6から12で前述のD-アミノ酸オキシダーゼを用いるD-アミノアシラーゼ活性測定法に則り酵素活性を測定して確認した。本酵素の至適pHを図5に示す。本酵素は、pH8からpH8.5付近で最も良く作用した。

## 【0058】

9. 金属イオンの影響は、0.5mol/L N-アセチル-D-バリンと本酵素液(500U)を含む反応液に、終濃度1mmol/Lになるように、塩化カルシウム・2水和物、塩



化鉄(III)・6水和物、塩化ナトリウム、塩化コバルト(II)・6水和物、塩化カリウム、塩化ニッケル・6水和物、塩化マグネシウム・6水和物、硫酸銅(II)・5水和物、塩化マンガン(II)・4水和物、塩化亜鉛、モリブデン酸ナトリウムを添加して、40℃で1日加温し、生成されたD-バリン量を以下に記述するHPLC法により測定し、検出されたN-アセチル-D-バリンとD-バリンの面積比から各金属を添加した場合の分割率を求め、金属イオン無添加における分割率を100として相対値を求めた。

その結果、表3に示すように本酵素は1mmol/Lの $Mn^{2+}$ 、 $Co^{2+}$ 、 $Ni^{2+}$ 、 $Cu^{2+}$ 、 $Zn^{2+}$ で活性が阻害された。

#### 【0059】

HPLC測定法は、Inertsil ODS-2 (GLサイエンス (株) 製) カラムを用い、0.015% 1-ペンタンスルホン酸ナトリウム(pH2.5) 80:アセトニトリル 20緩衝液を用い、流速0.5mL/分、検出230nm、カラム温度30℃でHPLC分析した。

#### 【0060】

【表3】

金属イオン 1.0mmol/L	相対活性(%)
無添加	100
塩化カルシウム	99
塩化鉄 (III)	88
塩化ナトリウム	99
塩化コバルト (II)	27
塩化カリウム	92
塩化ニッケル	20
塩化マグネシウム	90
硫酸銅 (II)	90
塩化マンガン (II)	48
塩化亜鉛	31
モリブデン酸ナトリウム	105

#### 【0061】

10. 阻害剤の影響は、0.5mol/L N-アセチル-D-バリンと本酵素液(500U)を含む反応液に、終濃度5mmol/Lになるようにエチレンジアミン四酢酸、2-メルカプトエタノール、N-エチルマレイミド、o-フェナントリン、L-システイン、ヨードアセトアミド、ジチオスレイトールを添加して40℃で1日加温し、生成されたD-バリン量を前述したHPLC法により測定し、検出されたN-アセチル-D-バリンとD-バリンの面積比から各阻害剤を添加した場合の分割率を求め、阻害剤無添加における分割率を100として相対値を求めた。

その結果、表4に示すように本酵素は5.0mmol/Lのジチオスレイトール、2-メルカプトエタノール、o-フェナントリン、L-システインで活性が阻害された。

#### 【0062】

【表 4】

阻害剤 5mmol/L	相対活性(%)
エチレンジアミン四酢酸	112
2-メルカプトエタノール	47
N-エチルマレイミド	100
o-フェナントリン	53
L-システイン	78
ヨードアセトアミド	107
ジチオスレイトール	38

## 【0063】

## 実施例 5 新規D-アミノアシラーゼのクローニング

本菌株のデフルビバクター エスピー A131-3 (Defluviobacter sp. A131-3) より精製を行い、単離されたD-アミノアシラーゼを元に、公知の方法により、そのN末及び内部アミノ酸配列を分析し、N末;KSFDLVIRNGRVVDP、内部;AQAQGLXITXEA、TALIPAQIVERの配列を得た。このアミノ酸から考えられるDNA配列をすべて包含したN末及び内部配列ミックスプライマーATHMGIAAYGGIMGIGTIGT (配列番号3)、及びCKYTCTIACDATYTGIGCIGG DAT (配列番号4) の2種類の調製を行った。なお、Iは、イノシンを表している。

次に、デフルビバクター エスピー A131-3培養菌体より、公知の方法を用いゲノムDNAの抽出を行った。

精製酵素から得られたミックスプライマーと、培養菌体より得られたゲノムDNAを用いHot Star Taq(QIAGEN製)でPCR反応を行った。PCRには、供給業者から提供される緩衝液中に以下のものを含む反応液(10 $\mu$ l)を使用した: dNTP 200 $\mu$ M、各プライマー 50pmol、デフルビバクター エスピー A131-3のゲノムDNA 100ng、およびDNAポリメラーゼ1ユニット。反応は、95 $^{\circ}$ Cでの変性15分間の後1) 95 $^{\circ}$ Cでの変性段階30秒間; 2) 40 $^{\circ}$ Cでのアニーリング段階30秒間; 3) 72 $^{\circ}$ Cでの合成段階90秒間を、30サイクル行った。アガロース電気泳動で確認したところ約1.3kbのDNA増幅があった。得られたPCR産物をpCR2.1topo (インビトロジェン社製)を用いてクローニングを行い、部分塩基配列(部分遺伝子)の決定を行った。

## 【0064】

得られた部分遺伝子を元に、プライマーATACCGCTACATCGGCAATCGCAT (配列番号5)、及びTGCCACTGGTTGAAGCCATCGCCA (配列番号6) の2種類を設計合成しInverse PCR法を用いてHot Star Taq(QIAGEN製)でPCR反応を行った。Inverse PCR法に用いる鋳型は、デフルビバクター エスピー A131-3から抽出した5 $\mu$ gのゲノムを制限酵素SalI(NEB)を用い37 $^{\circ}$ Cにて一晩消化・精製したものを、T4 Ligase(NEB)で環状化したものを用いた。反応は、95 $^{\circ}$ Cでの変性15分間の後1) 94 $^{\circ}$ Cでの変性段階30秒間; 2) 60 $^{\circ}$ Cでのアニーリング段階30秒間; 3) 72 $^{\circ}$ Cでの合成段階4分間を、30サイクル行った。得られたPCR産物をpCR2.1topoを用いてクローニングを行い、全塩基配列(全遺伝子)の決定を行った。

この塩基配列の結果から、N末の外側及びC末のプライマーATGGCCAAAAGCTTCGATCTC(配列番号7)、及びTCATCGCGCGTGCTCCGGATG (配列番号8) の作製を行い、Hot Star Taq(QIAGEN製)及びKOD plus(ROYUBO製)のポリメラーゼを用いてPCR反応を行った。Hot Star Taqの反応は、95 $^{\circ}$ Cでの変性15分間の後1) 94 $^{\circ}$ Cでの変性段階30秒間; 2) 58 $^{\circ}$ Cでのアニーリング段階30秒間; 3) 72 $^{\circ}$ Cでの合成段階2分間を、30サイクル行い、KOD plusの反応は、95 $^{\circ}$ Cでの変性2分間の後1) 94 $^{\circ}$ Cでの変性段階30秒間; 2) 58 $^{\circ}$ Cでのアニーリング段階30秒間; 3) 68 $^{\circ}$ Cでの合成段階2分間を30サイクル行った。得られたPCR産物をpCR2.1topoを用いてクローニングを行い、クローンの塩基配列を比較し、本発明D-アミノアシラーゼ遺伝子の塩基配列(配列番号1)並びに本

発明 D-アミノアシラーゼのアミノ酸配列(配列番号 2)を確定した。

【0065】

実施例 6 D-バリンの製造

15% N-アセチル-D, L-バリン水溶液を基質として用い、デフルビバクター エスピー A131-3 株由来の D-アミノアシラーゼが基質水溶液 1 mL 当たり 200 U の酵素量を添加し、40℃で3日間反応を行い、生成された N-アセチル-D, L-バリンから D-バリンの分割生成率を、実施例 1(2)記載の HPLC 測定法で測定した。結果を図 6 に示す。

本酵素を基質水溶液に 200 U/mL 含有する系で、反応 1 日目で N-アセチル-D, L-バリン中の N-アセチル-D-バリンの 90% 以上が D-バリンに変換されており、その分割率は 90% 以上であった。

また、N-アセチル-L-バリンはまったく分解されず、本酵素が D-アミノ酸の製造に関して実用性を有することが確認された。

【図面の簡単な説明】

【0066】

【図 1】 本酵素の電気泳動法による分子量測定時の電気泳動像を示す図である。

【図 2】 本酵素の温度安定性測定時の残存活性を示す図である。

【図 3】 本酵素の至適温度測定時の相対活性を示す図である。

【図 4】 本酵素の pH 安定性測定時の残存活性を示す図である。

【図 5】 本酵素の至適 pH 測定時の相対活性を示す図である。

【図 6】 N-アセチル-D, L-バリンの分割率を示す図である。

## 【配列表】

## SEQUENCE LISTING

<110> DAIICHI PURE CHEMICALS CO., LTD.  
Isobe, Kimiyasu

<120> D-aminoacylase

<130> P04551510

<150> JP 2002-366389

<151> 2002-12-18

<160> 8

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 1500

<212> DNA

<213> Defluviobacter sp. A131-3

<400> 1  
atggccaaaa gcttcgatct cgtcattcgc aacggcaggg tcgtcgatcc ggaaaccggt 60  
catgatgcga ttgccgatgt agcggatatcc ggcgccaga tcgttcagct cggctccgtcg 120  
ctaggtgccg gaaagaggga gatcgacgcg accgggctcg ttgtctcacc gggcttcatt 180  
gacctccatg cccacgggca atccattccc gccgaccgga tgcaggcctt cgacggcgtc 240  
accaccgcgc tggagcttga ggtgggctcg ctgcccgtcg cgcgctggta cgaacagcag 300  
caggccgggg gccgctgct caactacggg accgccgtg catggatctt cgcgcgcaag 360  
gccgtgatga tcggaatgga actcgatggc cgctcgcgc cgatcgagat gatgggtgcc 420  
ggctccgacg acatgcgctg gtcggtggac gccgcgactg cgccgcagac cgatgatatt 480  
gtccggctga cgcgtcaggc tctcgaagaa ggcgactcg gcatcgcat acctcacggc 540  
tatgccgccg gcgctggcgt caaggaaatg acgcgaatct gcgaactggc tgcagaattc 600  
gaccggccga cctatacca cattccctac atgtccaaca ttgaccccag aagctcggtc 660  
gaggcttatg tgcaactgat cggcctggcc ggtgcaaccg gcgcacacat gcatactgc 720  
caccttaaca gcaccagcct gcgggacgtc gaggatgccg cgaggctgat cgccaaagca 780  
caggcacagg gtcttccgat caccaccgag gcctatccct acggcacggg atcgaccgtg 840

atgagcgccc gcttcttcat tgactccgat tttgccgaac gaaccggaac gggctacgac 900  
gccatccagg tcgtctcgag cggcaagcgc tttgagaacc gggacgaact cgtggcagcg 960  
cgcgccgaaa ccccggaagc actgggtgctg tggcattatc tcgacaccga caatccccac 1020  
gatcagcggc tgctcgacgt ctcggtgatg tatccgggcg gcgccatcgc ctccgatgcg 1080  
gtgccgtgga gcaatccccga cgggacgctg tacaccggcg aggaatggcc gctcccggcc 1140  
gacaagacgt cccatccgcg ctcggccggc acctataccc gcttctcgc ccagtgggtg 1200  
cgcgaaacgc aggcgggtgcc actggttgaa gccatcgcca aatgcgcgct cattccagcg 1260  
cagatcgtcg agcgtgcag cgacgtgttc cgccgcaagg gccggcttca gcccggatgc 1320  
gacgccgaca tcgtgatttt cgaccttgaa tccgtgcagg acaggtcaac gttcgaggac 1380  
atgcacctcg ccgccgacgg catggtccat gtgctggta acggcgaggc cgtgatcgcg 1440  
aatggcgaac tcgtgcgcga cgcgcgttcc ggccgtgcca tccggagcac gccgcgatga 1500

<210> 2  
<211> 499  
<212> PRT  
<213> Defluviobacter sp.A131-3

<400> 2

Met Ala Lys Ser Phe Asp Leu Val Ile Arg Asn Gly Arg Val Val Asp  
1 5 10 15

Pro Glu Thr Gly His Asp Ala Ile Ala Asp Val Ala Val Ser Gly Gly  
20 25 30

Gln Ile Val Ala Val Gly Pro Ser Leu Gly Ala Gly Lys Arg Glu Ile  
35 40 45

Asp Ala Thr Gly Leu Val Val Ser Pro Gly Phe Ile Asp Leu His Ala  
50 55 60

His Gly Gln Ser Ile Pro Ala Asp Arg Met Gln Ala Phe Asp Gly Val  
65 70 75 80

Thr Thr Ala Leu Glu Leu Glu Val Gly Ser Leu Pro Val Ala Arg Trp  
85 90 95

Tyr Glu Gln Gln Gln Ala Gly Gly Arg Val Leu Asn Tyr Gly Thr Ala  
100 105 110

Ala Ala Trp Ile Phe Ala Arg Lys Ala Val Met Ile Gly Met Glu Leu  
115 120 125

Asp Gly Arg Leu Ala Pro Ile Glu Met Met Gly Ala Gly Ser Asp Asp  
130 135 140

Met Arg Trp Ser Val Asp Ala Ala Thr Ala Pro Gln Thr Asp Asp Ile  
145 150 155 160

Val Arg Leu Thr Arg Gln Ala Leu Glu Glu Gly Ala Leu Gly Ile Gly  
165 170 175

Ile Pro His Gly Tyr Ala Ala Gly Ala Gly Val Lys Glu Met Thr Arg  
180 185 190

Ile Cys Glu Leu Ala Ala Glu Phe Asp Arg Pro Thr Tyr Thr His Ile  
195 200 205

Pro Tyr Met Ser Asn Ile Asp Pro Arg Ser Ser Val Glu Ala Tyr Val  
210 215 220

Gln Leu Ile Gly Leu Ala Gly Ala Thr Gly Ala His Met His Ile Cys  
225 230 235 240

His Leu Asn Ser Thr Ser Leu Arg Asp Val Glu Asp Ala Ala Arg Leu  
245 250 255

Ile Ala Lys Ala Gln Ala Gln Gly Leu Pro Ile Thr Thr Glu Ala Tyr  
260 265 270

Pro Tyr Gly Thr Gly Ser Thr Val Met Ser Ala Arg Phe Phe Ile Asp

275

280

285

Ser Asp Phe Ala Glu Arg Thr Gly Thr Gly Tyr Asp Ala Ile Gln Val  
290 295 300

Val Ser Ser Gly Lys Arg Phe Glu Asn Arg Asp Glu Leu Val Ala Ala  
305 310 315 320

Arg Ala Glu Thr Pro Glu Ala Leu Val Leu Trp His Tyr Leu Asp Thr  
325 330 335

Asp Asn Pro His Asp Gln Arg Leu Leu Asp Val Ser Val Met Tyr Pro  
340 345 350

Gly Gly Ala Ile Ala Ser Asp Ala Val Pro Trp Ser Asn Pro Asp Gly  
355 360 365

Thr Leu Tyr Thr Gly Glu Glu Trp Pro Leu Pro Ala Asp Lys Thr Ser  
370 375 380

His Pro Arg Ser Ala Gly Thr Tyr Thr Arg Phe Leu Ala Gln Trp Val  
385 390 395 400

Arg Glu Arg Glu Ala Val Pro Leu Val Glu Ala Ile Ala Lys Cys Ala  
405 410 415

Leu Ile Pro Ala Gln Ile Val Glu Arg Cys Ser Asp Val Phe Arg Arg  
420 425 430

Lys Gly Arg Leu Gln Pro Gly Cys Asp Ala Asp Ile Val Ile Phe Asp  
435 440 445

Leu Glu Ser Val Gln Asp Arg Ser Thr Phe Glu Asp Met His Leu Ala  
450 455 460

Ala Asp Gly Met Val His Val Leu Val Asn Gly Glu Ala Val Ile Ala  
465 470 475 480

Asn Gly Glu Leu Val Arg Asp Ala Arg Ser Gly Arg Ala Ile Arg Ser  
485 490 495

Thr Pro Arg

<210> 3  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> artificial sequence

<220>  
<223> Designed primer based on Defulvibacter sp.

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (6)..(6)  
<223> n stands for i

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (12)..(12)  
<223> n stands for i

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (15)..(15)  
<223> n stands for i

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (18)..(18)  
<223> n stands for i

<400> 3  
athmgnaayg gnmngtngt

20

<210> 4  
<211> 23  
<212> DNA  
<213> artificial sequence



&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Designed primer based on Defluviobacter sp.

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; misc\_feature

&lt;222&gt; (6)..(6)

&lt;223&gt; n stands for i

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; misc\_feature

&lt;222&gt; (15)..(15)

&lt;223&gt; n stands for i

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; misc\_feature

&lt;222&gt; (18)..(18)

&lt;223&gt; n stands for i

&lt;400&gt; 4

ckytcnacda tytgngcngg dat

23

&lt;210&gt; 5

&lt;211&gt; 24

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; artificial sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Designed primer based on Defluviobacter sp.

&lt;400&gt; 5

ataccgctac atcggcaatc gcat

24

&lt;210&gt; 6

&lt;211&gt; 24

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; artificial sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Designed primer based on Defluviobacter sp.

&lt;400&gt; 6

tgccactggt tgaagccatc gccca

24

&lt;210&gt; 7

<211> 21  
 <212> DNA  
 <213> artificial sequence

<220>  
 <223> Designed primer based on Defluviobacter sp.

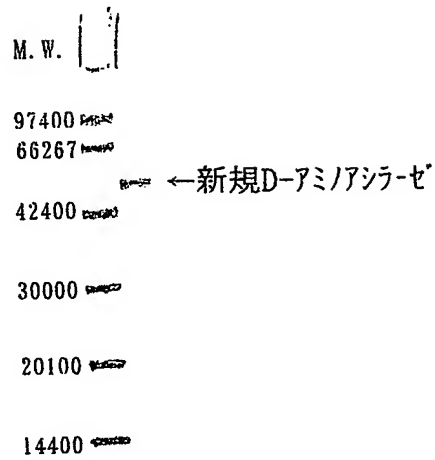
<400> 7  
 atggcctaaa gcttcgatct c 21

<210> 8  
 <211> 22  
 <212> DNA  
 <213> artificial sequence

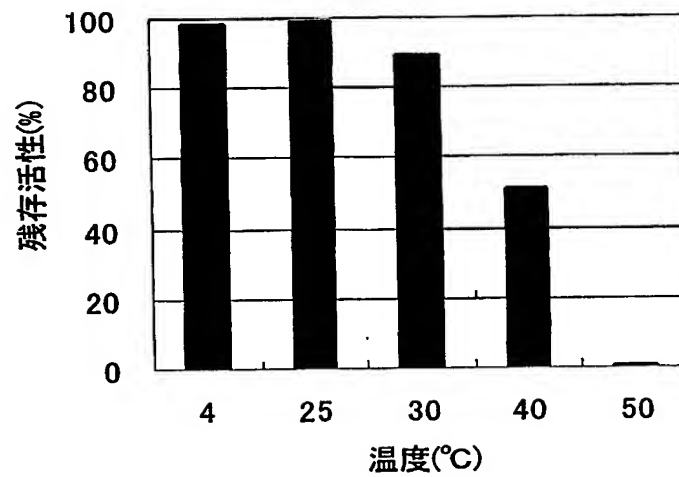
<220>  
 <223> Designed primer based on Defluviobacter sp.

<400> 8  
 tcatcgcggc gtgctccgga tg 22

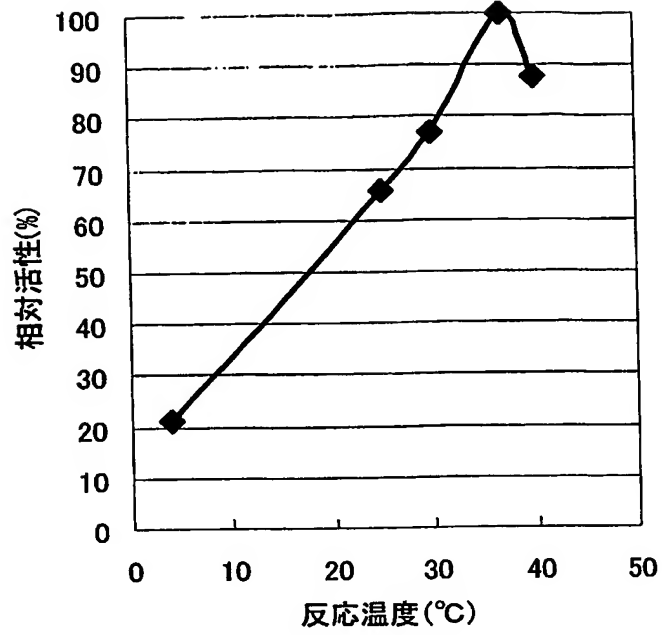
【書類名】 図面  
【図 1】



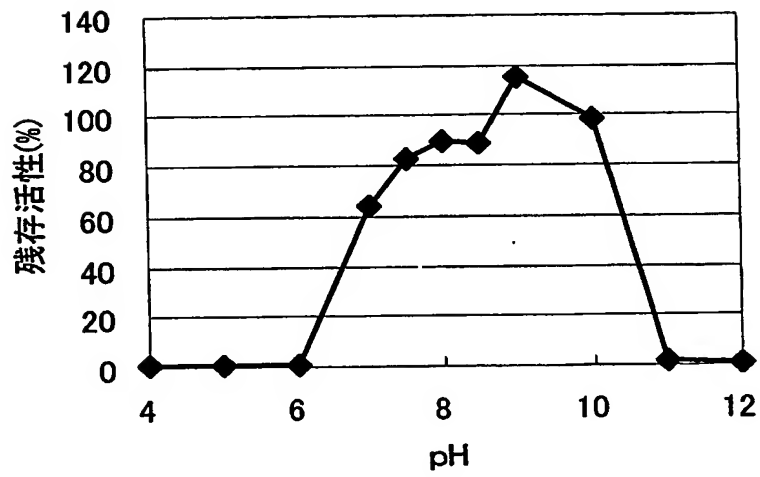
【図 2】



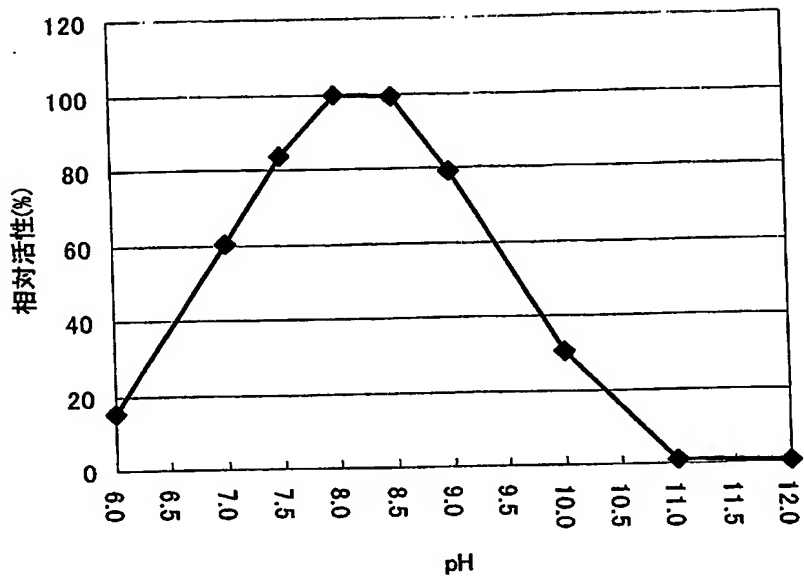
【図 3】



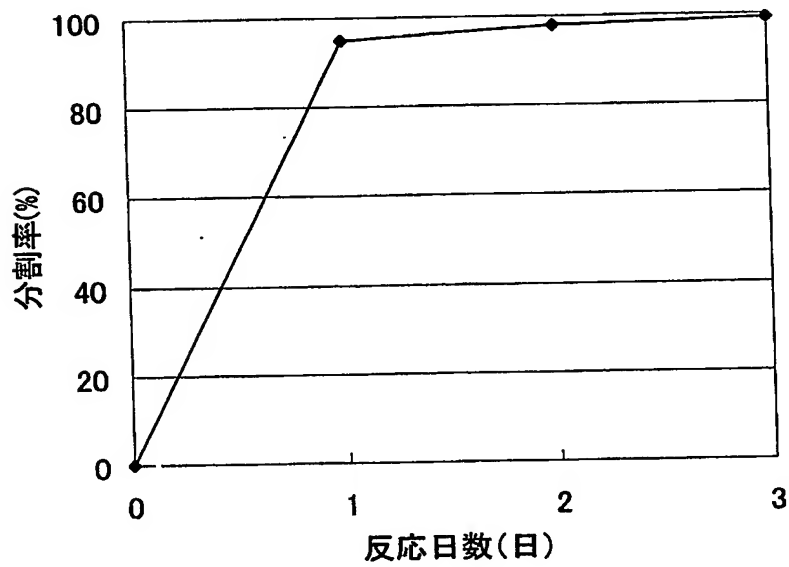
【図 4】



【図 5】



【図 6】



## 【書類名】要約書

## 【要約】

【課題】 基質特異性が高く、N-アセチル-D, L-アミノ酸よりD-アミノ酸を簡便かつ効率的さらに安価に製造することができるD-アミノアシラーゼの提供。

【解決手段】 デフルビバクター (Defluviobacter) 属に属する微生物が生産するN-アセチル-D-アミノ酸に作用し、分子量 (電気泳動) 約55,000ダルトン、等電点 (変性系2次元電気泳動) 5.3、N-アセチル-D-バリン、N-アセチル-D-ロイシン等に作用し、N-アセチル-L-バリン、N-アセチル-L-ロイシン等に作用しない、至適温度37℃ (pH8)、至適pH8~8.5 (37℃)、1mmol/Lの $Mn^{2+}$ 、 $Co^{2+}$ 、 $Ni^{2+}$ 、 $Cu^{2+}$ 、 $Zn^{2+}$ で活性が阻害され、5mmol/Lのジチオスレイトール、2-メルカプトエタノール、o-フェナントリン、L-システインで活性が阻害されるD-アミノアシラーゼ。

【選択図】 図1

認定・付加情報

特許出願の番号

特願 2003-351560

受付番号

50301690128

書類名

特許願

担当官

角田 芳生

1918

作成日

平成15年10月16日

<認定情報・付加情報>

【提出日】

平成15年10月10日

特願 2003-351560

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[390037327]

1. 変更年月日

1990年12月12日

[変更理由]

新規登録

住 所

東京都中央区日本橋3丁目13番5号

氏 名

第一化学薬品株式会社



特願 2003-351560

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[302068704]

1. 変更年月日

2002年12月 3日

[変更理由]

新規登録

住 所

岩手県盛岡市黒石野3丁目15-40

氏 名

磯部 公安